

УДК 577.121

Инактивация малатных ферментов улучшает анаэробную продукцию четырехуглеродных дикарбоновых кислот рекомбинантными штаммами *Escherichia coli*, экспрессирующими пируваткарбоксилазу

© 2018 А.Ю. СКОРОХОДОВА*, А.Ю. ГУЛЕВИЧ, В.Г. ДЕБАБОВ

ФГБУ Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра "Курчатовский институт", Москва, 117545

e-mail: skorokhodova@genetika.ru*

Поступила 04.12.2017 г.

Принята в печать 12.12.2017 г.

Гены *maeA* и *maeB*, кодирующие NADH- и NADPH-зависимые малатные ферменты были делетированы у рекомбинантного штамма *Escherichia coli* с инактивированными путями смешанно-кислотного брожения и модифицированной системой транспорта и фосфорилирования глюкозы при гетерологичной экспрессии гена пируваткарбоксилазы. В ходе анаэробной утилизации глюкозы родительский штамм синтезировал яблочную, фумаровую и янтарную кислоты в качестве основных продуктов брожения, тогда как главным побочным продуктом являлась пировиноградная кислота, сформированная в результате действия футильного цикла пировиноградная кислота–щавелевоуксусная кислота–яблочная кислота–пировиноградная кислота. При индивидуальных делециях генов *maeA* и *maeB* мутантные штаммы с повышенной эффективностью конвертировали глюкозу в четырехуглеродные дикарбоновые кислоты, секретировав, тем не менее, значимые количества пировиноградной кислоты. Инактивация обоих малатных ферментов у сконструированного штамма значительно повышала долю яблочной, фумаровой и янтарной кислот среди сформированных продуктов брожения при выраженном снижении секреции пировиноградной кислоты и других побочных продуктов в результате прекращения функционирования футильного цикла, конкурентного по отношению к целевым процессам биосинтеза.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, глюкоза, брожение, малатный фермент, метаболическая инженерия, пируваткарбоксилаза, фумаровая кислота, яблочная кислота, янтарная кислота.

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-2-18-25

Четырехуглеродные дикарбоновые кислоты, в частности, яблочная, фумаровая и янтарная, являются промышленно значимыми химикатами, способными служить универсальными строительными блоками в органическом синтезе широкого спектра продуктов с высокой добавленной стоимостью [1]. В настоящее время эти кислоты получают нефтехимическим способом. Однако, являясь консервативными интермедиатами метаболизма множества организмов, соответствующие соединения могут быть получены посредством микробного синтеза из возобновляемого расти-

тельного сырья, что может представлять экологически оправданную альтернативу традиционным ресурсо- и энергозатратным процессам.

Природными продуцентами яблочной, фумаровой и янтарной кислот являются *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* [2], *Rhizopus oryzae* [3], *Actinobacillus succinogenes* [4], *Anaerobiospirillum succiniciproducens* [5] и *Mannheimia succiniciproducens* [6]. Однако в силу своих характеристик [7] природные продуценты не могут на сегодняшний день обеспечить основу экономически оправданных промышленных процессов биотехнологического

Список сокращений: ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ГШ – глиоксилатный шунт; КЖ – культуральная жидкость; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ФЕП – фосфоенолпируват; ЦТК – цикл трикарбоновых кислот; ЩУК – щавелевоуксусная кислота.

получения соответствующих дикарбоксилатов. Вместе с тем благодаря удобству в работе и доступности инструментария прецизионного генетического редактирования значительный прогресс в конструировании рекомбинантных продуцентов соответствующих соединений был достигнут с использованием в качестве биосинтетической платформы клеток *Escherichia coli* [8].

Факультативно-анаэробная бактерия *E. coli* способна формировать яблочную, фумаровую и янтарную кислоты при утилизации углеродного субстрата как в анаэробных, так и в аэробных условиях. В отсутствие кислорода основным путем биосинтеза этих кислот в клетках *E. coli* служат реакции восстановительной ветви цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), тогда как при аэрации соответствующие интермедиаты образуются в ходе функционирования полного оксидативного ЦТК. При этом анаэробный синтез четырехуглеродных дикарбоксилатов является более выгодным, так как способен обеспечить высокий выход целевых продуктов за счет фиксации CO₂ на стадии образования ЩУК, ключевого метаболита-предшественника восстановительной ветви ЦТК. Тем не менее, на сегодняшний день анаэробная конверсия глюкозы, традиционного субстрата микробной биотехнологии, в целевую дикарбоновую кислоту с выходом, близким к максимальному теоретическому значению, была достигнута с использованием сконструированных штаммов *E. coli* только в случае янтарной кислоты, эффективный биосинтез которой предполагает участие не только восстановительной ветви ЦТК, но и реакций гликолатного шунта (ГШ) [9–11]. Таким образом, разработка подходов к созданию высокоэффективных микробных продуцентов не только янтарной, но также яблочной и фумаровой кислот остается актуальной задачей.

Стандартные подходы, направленные на обеспечение эффективной анаэробной продукции четырехуглеродных дикарбоновых кислот в клетках *E. coli*, включают повышение внутриклеточной доступности ЩУК для целевых биосинтетических реакций восстановительной ветви ЦТК. Соответствующий эффект обычно достигается в результате повышения экспрессии генов, кодирующих анаэробные ферменты [12, 13]. Основными анаэробными ферментами бактерий, ответственными за формирование ЩУК из гликолитических предшественников, являются карбоксилирующие ФЕП фосфоенолпируваткарбоксилаза (КФ 4.1.1.31) и фосфоенолпируваткарбоксикиназа (КФ 4.1.1.49), а также пируваткар-

боксилаза (КФ 6.4.1.1), использующая в качестве субстрата пирувиноградную кислоту [14]. Клетки *E. coli* обладают обоими карбоксилирующими ФЕП ферментами, тогда как активность пируваткарбоксилазы у этой бактерии отсутствует. Вследствие этого наличие гетерологичной пируваткарбоксилазы в рекомбинантных штаммах *E. coli* способствует повышению гибкости и эффективности анаэробных процессов [14, 15]. Однако было показано, что гетерологичная экспрессия гена пируваткарбоксилазы у штамма *E. coli*, направленно сконструированного для анаэробной конверсии глюкозы в четырехуглеродные дикарбоновые кислоты, приводила к возникновению футильного цикла пирувиноградная кислота–ЩУК–яблочная кислота–пирувиноградная кислота, обусловленному декарбоксилирующей активностью клеточных малатных ферментов (КФ 1.1.1.39/40) [16]. Очевидно, что функционирование выявленного футильного цикла, непродуктивно расходующего пирувиноградную и щавелевоуксусную кислоты, является конкурентным по отношению к биосинтезу целевых дикарбоксилатов, происходящему по восстановительной ветви ЦТК, и может оказывать негативное влияние на эффективность их анаэробной продукции из глюкозы.

Целью работы было исследование эффекта инактивации малатных ферментов на анаэробную продукцию четырехуглеродных дикарбоновых кислот рекомбинантными штаммами *Escherichia coli*, экспрессирующими пируваткарбоксилазу.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Бактериальные штаммы, плазмиды и среды

Использованные в работе штаммы, плазмиды и праймеры представлены в табл. 1.

Штамм *E. coli* K-12 MG1655 (ВКПМ В-6195) и ранее сконструированный штамм *E. coli* MSG1.0 $\Delta frdAB \Delta pflB$ [17], обозначенный как FP и обладающий модифицированной системой транспорта и фосфорилирования глюкозы, делетированной пируват-формиат-лиазой (КФ 2.3.1.54), и инактивированными путями смешанно-кислотного брожения, были использованы в качестве исходных для конструирования всех полученных в работе штаммов. Бактерии культивировали в богатых средах LB, SOB и SOC, а также в минимальной среде M9 [18] с добавлением при необходимости 100 мкг/мл ампициллина («Синтез», Россия) или 30 мкг/мл хлорамфеникола (Sigma, США).

Штаммы, плазмиды и олигонуклеотидные праймеры, использованные в настоящей работе

Strains, plasmids and oligonucleotide primers used in this work

Название	Генотип/последовательность 5'→3'	Источник
Штаммы		
MG1655	<i>E. coli</i> дикого типа (ВКПМ В-6195)	ВКПМ
FP	<i>E. coli</i> MSG1.0 (MG1655 Δ ackA-pta, Δ proxB, Δ ldhA, Δ adhE, Δ ptsG, P ₁ glk, P _{tac} galP) Δ frdAB, Δ prfB	[17] Коллекция лаборатории
FP Δ maeA	<i>E. coli</i> MSG1.0 Δ frdAB, Δ prfB, Δ maeA	» »
FP Δ maeB	<i>E. coli</i> MSG1.0 Δ frdAB, Δ prfB, Δ maeB	» »
FP Δ maeA Δ maeB	<i>E. coli</i> MSG1.0 Δ frdAB, Δ prfB, Δ maeA, Δ maeB	» »
Плазмиды		
pMW118-(λ attL-Cm- λ attR)	pSC101, bla, cat, λ attL-cat- λ attR	[19]
pKD46	pINT-ts, bla, P _{araB} - λ gam-bet-exo	[20]
pMWts-Int/Xis	pSC101-ts, bla, P _R - λ xis-int, cIts857	[21]
pPYC	pMW119 с клонированным геном пируваткарбоксилазы (<i>pusA</i>) из <i>B. subtilis</i>	[22]
Праймеры		
P1	gatggatattcaaaaaagagtgagtgacatggaacccgctcaagttagtataaaaaagctgaac	Данная работа
P2	ttagatggaggtacggcggtagtcgcggtattcggctgaagcctgctttttataactaagttgg	» »
P3	aatggatgaccagtaaaacaagtgacattgatttcgctcaagttagtataaaaaagctgaac	» »
P4	ttacagcggttggtttgcgctctaccacggccagtgaaagcctgctttttataactaagttgg	» »
P5	cgctgaaaagtaattcataaccatc	» »
P6	gttctgcatagcaggtgaggc	» »
P7	gacaggcatggtattgctgg	» »
P8	gagagatattcgctgtggtgc	» »

Реагенты

В работе использовали *Taq*-ДНК-полимеразу (Thermo Scientific, Литва), олигонуклеотидные праймеры (см. табл. 1), синтезированные ООО «Евроген» (Россия), компоненты питательных сред, соли и другие реагенты (производства Panreac, Испания и Sigma, США). Полученные ПЦР-продукты очищали методом электрофореза в агарозном геле и выделяли с помощью набора QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, США).

Конструирование штаммов и плазмид

Все хромосомные модификации осуществляли с использованием модифицированной [19] методики, разработанной Даченко и Ваннером [20]. Линейные фрагменты ДНК для инактивации генов *maeA* и *maeB*, содержащие маркер устойчивости к хлорамфениколу (ген *cat*), получали при помощи ПЦР с использованием двух пар праймеров (P1, P2 и P3, P4) и плаз-

миды pMW118-(λ attL-Cm- λ attR) [19] в качестве матрицы (см. табл. 1). Полученные фрагменты ДНК были индивидуально интегрированы в хромосому штамма *E. coli* MG1655, несущего плазмиду-помощник pKD46 [20]. Факт соответствия предполагаемых и полученных экспериментально структур хромосом отобранных штаммов с индивидуально инактивированными генами *maeA* и *maeB* подтверждали ПЦР-анализом с помощью пар локус-специфичных праймеров – P5, P6 и P7, P8.

Штаммы FP Δ maeA, FP Δ maeB и FP Δ maeA Δ maeB были получены при введении полученных индивидуальных модификаций в хромосому штамма FP с помощью P1-зависимой трансдукции [18]. Удаление из хромосом целевых штаммов маркера, фланкированного *att*-сайтами фага лямбда, проводили с использованием плазмиды pMWts-Int/Xis, как описано ранее [21]. Трансформацию штаммов плазмидой pPYC [22] осуществляли по стандартной методике.

Культивирование штаммов для биосинтеза дикарбоновых кислот

Клетки штаммов FP [pPYC], FP Δ maeA [pPYC], FP Δ maeB [pPYC] и FP Δ maeA Δ maeB [pPYC] выращивали в течение ночи в среде M9, содержащей 2 г/л глюкозы, при 37 °С. К 5 мл ночной культуры добавляли 45 мл среды M9, содержащей 10 г/л глюкозы и 10 г/л дрожжевого экстракта. Полученную культуру выращивали в колбах объемом 750 мл при 37 °С на роторной качалке при 250 об/мин в течение 8 ч. Клеточную суспензию центрифугировали в течение 15 мин при 2000 г и 4 °С. Осадок ресуспендировали в 15 мл среды M9, содержащей 10 г/л глюкозы и 10 г/л NaHCO₃. В дальнейшем культуру инкубировали в течение 24 ч в пробирках объемом 15 мл с завинчивающимися крышками при 37 °С на роторной качалке (250 об/мин). Все среды дополнительно содержали 100 мкг/мл ампициллина.

Затем клеточную суспензию центрифугировали в течение 10 мин при 10 000 г и в полученном супернатанте определяли концентрацию секретированных метаболитов и остаточной глюкозы. Все эксперименты повторяли не менее трех раз, результаты повторных экспериментов варьировали в диапазоне, не превышающем 10%.

Аналитические методы

Концентрацию органических кислот в КЖ, освобожденной от биомассы центрифугированием, определяли методом ВЭЖХ с использованием системы Waters HPLC system (Waters, США). Применяли ион-эксклюзионную колонку Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%), 300 × 7,8 мм, 8 мкм (Phenomenex, США) с детекцией при длине волны 210 нм. В качестве подвижной фазы использовали водный раствор серной кислоты (2,5 мМ) со скоростью потока 0,5 мл/мин. Для измерения концентрации глюкозы система была укомплектована рефрактивным детектором Waters 2414 и колонкой Spherisorb-NH₂, 4,6 × 250 мм, 5 мкм (Waters). Подвижной фазой служил ацетонитрил в смеси с водой (объемное соотношение 75:25) при скорости потока 1 мл/мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

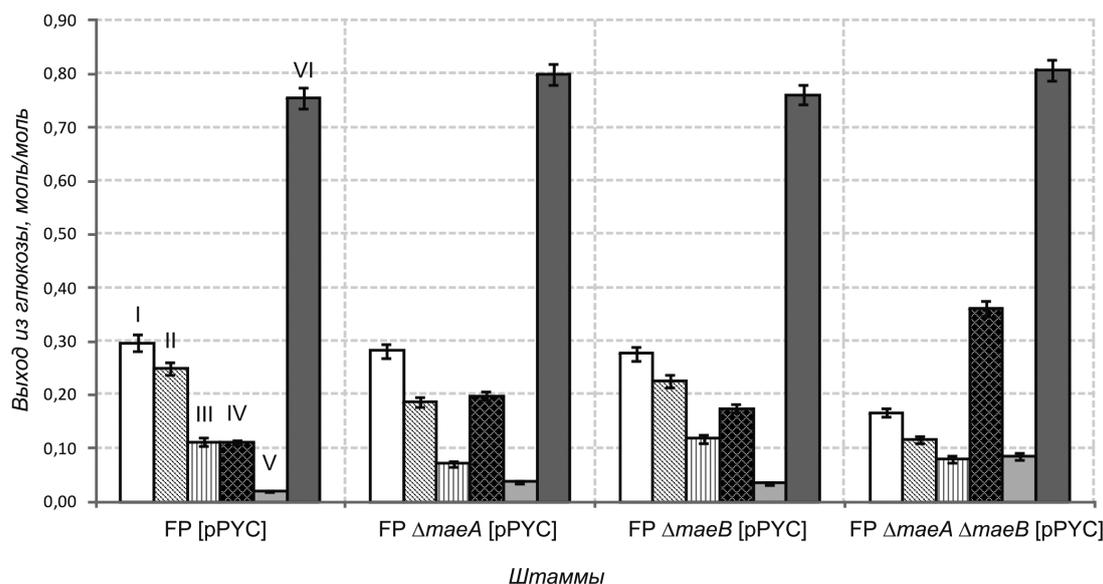
Для изучения влияния инактивации малатных ферментов на анаэробную продукцию четырехуглеродных дикарбоновых кислот рекомбинантными штаммами *Escherichia coli*, экспрессирующими пируваткарбоксылазу, в качестве базового исполь-

зовали штамм FP (см. табл. 1). Данный штамм был ранее направленно сконструирован для анаэробной продукции яблочной, фумаровой и янтарной кислот из глюкозы по восстановительной ветви ЦТК. Основные пути смешанно-кислотного брожения у штамма были инактивированы путем делеции генов *ackA*, *pta*, *poxB*, *ldhA* и *adhE*, кодирующих ключевые ферменты *E. coli*, ответственные за образование уксусной кислоты, молочной кислоты и этанола. Внутриклеточная доступность ФЕП, субстрата клеточных ЩУК-синтезирующих анаэробических ферментов, была повышена за счет обеспечения ФЕП-независимого транспорта и фосфорилирования глюкозы. Формирование полного спектра четырехуглеродных интермедиатов ЦТК – яблочной, фумаровой и янтарной кислот – было обеспечено в результате делеции генов *frdAB*, кодирующих каталитические компоненты фумаратредуктазного комплекса (КФ 1.3.5.4). Анаэробный биосинтез соответствующих метаболитов в клетках штамма FP и его производных предполагал, таким образом, вовлечение ЩУК в серию остаточных реакций брожения, включающих, в частности, превращения, катализируемые малатдегидрогеназой (КФ 1.1.1.37), фумаразами (КФ 4.2.1.2) и аэробно синтезированной сукцинатдегидрогеназой (КФ 1.3.5.1) [16, 17]. При этом вклад реакций ГШ в биосинтез яблочной и янтарной кислот у штамма был снижен благодаря инактивации гена *pflB*, кодирующего пируват-формиат-лиазу (КФ 2.3.1.54), основной фермент, снабжающий клетку *E. coli* ацетил-КоА в условиях анаэробноза.

При анаэробной утилизации глюкозы штамм FP [pPYC], экспрессирующий пируваткарбоксылазу *B. subtilis*, синтезировал яблочную, фумаровую и янтарную кислоты с молярным выходом, составляющим около 0,11, 0,02 и 0,76 моль/моль, соответственно (рисунок).

При этом доля четырехуглеродных метаболитов среди продуктов брожения у полученных штаммов составляла лишь 57,4% (табл. 2), а основным побочным продуктом являлась пировиноградная кислота (см. рисунок).

Значительная секреция штаммом пировиноградной кислоты являлась следствием активности ранее выявленного футильного цикла пировиноградная кислота–ЩУК–яблочная кислота–пировиноградная кислота, обусловленного действием клеточных малатных ферментов [16]. Клетки *E. coli* обладают двумя малатными ферментами, NADH-зависимым MaeA (КФ 1.1.1.39) и NADPH-зависимым MaeB (КФ 1.1.1.40) [23]. Можно было предположить, что основным малатным



Молярный выход метаболитов, синтезированных исследованными штаммами при анаэробной утилизации глюкозы: I – пируват; II – лактат; III – ацетат; IV – малат; V – фумарат; VI – сукцинат

Molar yield of metabolites synthesized by investigated strains during anaerobic glucose utilization: I, pyruvate; II, lactate; III, acetate; IV, malate; V, fumarate; VI, succinate

ферментом, обеспечивающим функционирование футильного цикла, служил NADH-зависимый MaeA. Действительно, базальная активность NADH-зависимого малатного фермента в клетках *E. coli* относительно высока [24]. Кроме свидетельств о позитивном или нейтральном эффекте сверхэкспрессии гена *maeA* на анаэробную продукцию янтарной кислоты штаммами *E. coli* [25] сообщалось также о возрастающем биосинтезе интермедиатов восстановительной ветви ЦТК при инактивации соответствующего гена [26, 27]. В связи с этим у штамма FP [pPYC] был прежде всего инактивирован ген, кодирующий NADH-зависимый малатный фермент.

В ходе анаэробной утилизации глюкозы полученный штамм FP ΔmaeA [pPYC] синтезировал яблочную кислоту с выходом ~0,2 моль/моль, кото-

рый увеличивался в первую очередь за счет снижения секреции пировиноградной и молочной кислот (см. рисунок). Выход фумаровой и янтарной кислот также был несколько повышен, и суммарная доля сформированных штаммом четырехуглеродных дикарбоксилатов достигала 65,7% от всех продуктов брожения (см. табл. 2). Таким образом, инактивация NADH-зависимого малатного фермента в некоторой степени достоверно снижала у штамма FP ΔmaeA [pPYC] активность футильного цикла пировиноградная кислота–ЩУК–яблочная кислота–пировиноградная кислота, обеспечивая повышенный синтез целевых четырехуглеродных дикарбоновых кислот. Однако распределение синтезированных штаммом метаболитов указывало на то, что гликолитический поток углерода не был полностью направлен в восстановительную

Таблица 2

Характеристики ферментативного метаболизма сконструированных штаммов при анаэробной утилизации глюкозы

Characteristics fermentative of metabolism in constructed strains during anaerobic glucose utilization

Штамм	Доля четырехуглеродных метаболитов (%) среди	
	секретированных продуктов брожения	детектированных восстановленных продуктов брожения
FP [pPYC]	57,4	78,1
FP ΔmaeA [pPYC]	65,7	84,8
FP ΔmaeB [pPYC]	61,0	81,1
FP ΔmaeA ΔmaeB [pPYC]	77,6	91,5

ветвь ЦТК. При этом сохраняющаяся значимая продукция молочной кислоты указывала на то, что эффективное реокисление восстановленных эквивалентов не могло быть обеспечено у штамма одними NADH-зависимыми реакциями образования яблочной, фумаровой и янтарной кислот. Секреция молочной кислоты штаммами, лишенными ферментативной лактатдегидрогеназы LdhA (КФ 1.1.1.28), свидетельствовала об активации респираторных лактатдегидрогеназ Dld (КФ 1.1.5.12) и/или LldD, которая компенсировала недостаточность процессов брожения для поддержания клеточного окислительно-восстановительного баланса. Тем не менее, вклад респираторных ферментов в формирование восстановленных продуктов анаэробной утилизации глюкозы штаммом *FP ΔmaeA* [pPYC] снижался по сравнению с родительским штаммом *FP* [pPYC] и доля четырехуглеродных метаболитов среди этих соединений достигала 84,8% (см. табл. 2).

Принимая во внимание эти наблюдения, нельзя было исключить, что из-за особенностей поддержания внутриклеточного баланса NADH/NADPH при анаэробнозе определенная роль в функционировании футильного цикла пировиноградная кислота–ЩУК–яблочная кислота–пировиноградная кислота принадлежит также клеточному NADPH-зависимому малатному ферменту. Для проверки данной гипотезы ген, кодирующий этот фермент, был также инактивирован у базового штамма-продуцента.

Профиль метаболитов, синтезированных полученным штаммом *FP ΔmaeB* [pPYC] при анаэробной утилизации глюкозы, был сравним с профилем, наблюдаемым у штамма *FP ΔmaeA* [pPYC] (см. рисунок). Несмотря на то, что молярный выход яблочной, фумаровой и янтарной кислот был несколько ниже, чем у штамма *FP ΔmaeA* [pPYC], он все же превосходил показатели родительского штамма *FP* [pPYC], указывая на негативное влияние активности NADPH-зависимого малатного фермента на анаэробное формирование четырехуглеродных интермедиатов ЦТК.

В связи с полученными данными у базового штамма были инактивированы оба гена, кодирующие малатные ферменты. Продукция пировиноградной и молочной кислот, синтезированных штаммом *FP ΔmaeA ΔmaeB* [pPYC] при анаэробной утилизации глюкозы, резко снижалась не только по сравнению с исходным штаммом *FP* [pPYC], но также и с контрольными штаммами *FP ΔmaeA* [pPYC] и *FP ΔmaeB* [pPYC] (см. рисунок). Наряду с этим значительно возростала секреция штам-

мом яблочной кислоты; при этом молярный выход данного дикарбоксилата из глюкозы достигал ~0,36 моль/моль. Выход фумаровой кислоты повышался практически в 2 раза (см. рисунок). В результате, несмотря на фактически не изменившийся уровень синтеза янтарной кислоты, доля целевых четырехуглеродных дикарбоксилатов среди продуктов брожения, сформированных штаммом *FP ΔmaeA ΔmaeB* [pPYC], повышалась до 77,6%, а их доля среди восстановленных метаболитов достигала 91,5% (см. табл. 2). Последний результат свидетельствует о том, что прекращение функционирования футильного цикла пировиноградная кислота–ЩУК–яблочная кислота–пировиноградная кислота позволяло штамму *FP ΔmaeA ΔmaeB* [pPYC] эффективно реокислять гликолитически сформированные NADH-эквиваленты в реакциях восстановительной ветви ЦТК при интенсивном формировании необходимого предшественника (ЩУК) под действием как ФЕП-, так и пируваткарбоксилирующих анаплеротических ферментов. Поскольку соответствующий ферментативный процесс непосредственно сопряжен с биосинтезом яблочной, фумаровой и янтарной кислот, размыкание футильного цикла позволило в итоге обеспечить повышенный анаэробный синтез целевых дикарбоксилатов сконструированным штаммом. Остаточная секреция штаммом пировиноградной, молочной и уксусной кислот была, по-видимому, обусловлена неоптимальным распределением потоков углерода в метаболическом узле ФЕП–пировиноградная кислота–ацетил-КоА. Эффективная координация реакций соответствующего метаболического узла, способствующая предпочтительному формированию ЩУК, может быть в дальнейшем достигнута путем сверхэкспрессии генов *pps* и/или *pskA*, кодирующих фосфоенолпируваткарбоксилазу и фосфоенолпируваткарбоксикиназу, и снижения интенсивности остаточной конверсии пировиноградной кислоты в ацетил-КоА под действием пируватдегидрогеназы.

Таким образом, результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что инактивация малатных ферментов способствует повышению синтеза четырехуглеродных дикарбоновых кислот по восстановительной ветви ЦТК штаммами *E. coli*, формирующими ЩУК с участием пируваткарбоксилазы, и, по-видимому, является необходимым условием для обеспечения эффективной и сбалансированной в окислительно-восстановительном аспекте анаэробной продукции целевых соединений из глюкозы.

Работа проведена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-14-10389).

ЛИТЕРАТУРА

1. Werpy T., Petersen G., Aden A., Bozell J., Holladay J., White J., Manheim A., Eliot D., Lasure L., Jones S. Top value added chemicals from biomass. Volume 1: Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. Washington DC, USA: Pacific Northwest National Laboratory, National Renewable Energy Laboratory and Department of Energy, 2004, 76 p.
2. West T.P. Malic acid production from thin stillage by *Aspergillus species*. *Biotechnol. Lett.*, 2011, 33(12), 2463–2467. doi: 10.1007/s10529-011-0720-7
3. Roa Engel C.A., Straathof A.J., Zijlmans T.W., et al. Fumaric acid production by fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, 78(3), 379–389. doi: 10.1007/s00253-007-1341-x
4. Guettler M.V., Rumler D., Jain M.K. *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1999, 49(1), 207–216. doi: 10.1099/00207713-49-1-207.
5. Nghiem N.P., Davison B.H., Suttle B.E., and Richardson G.R. Production of succinic acid by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1997, 63-65, 565–576. doi: 10.1007/bf02920454
6. Lee P.C., Lee S.Y., Hong S.H., and Chang H.N. Isolation and characterization of a new succinic acid-producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, from bovine rumen. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, 58(5), 663–668. doi: 10.1007/s00253-002-0935-6
7. Yin X., Li J., Shin H.D., et al. Metabolic engineering in the biotechnological production of organic acids in the tricarboxylic acid cycle of microorganisms: Advances and prospects. *Biotechnol. Adv.*, 2015, 33(6:1), 830–841. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.04.006
8. Liu J., Li J., Shin H.D., et al. Protein and metabolic engineering for the production of organic acids. *Bioresour. Technol.*, 2017, 239, 412–421. doi: 10.1016/j.biortech.2017.04.052
9. Vemuri G.N., Eiteman M.A., and Altman E. Effects of growth mode and pyruvate carboxylase on succinic acid production by metabolically engineered strains of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68(4), 1715–1727. doi: 10.1128/AEM.68.4.1715-1727.2002
10. Sánchez AM, Bennett GN, and San KY. Novel pathway engineering design of the anaerobic central metabolic pathway in *Escherichia coli* to increase succinate yield and productivity. *Metab. Eng.*, 2005, 7(3), 229–239. doi: 10.1016/j.ymben.2005.03.001
11. Skorokhodova A.Y., Morzhakova A.A., Gulevich A.Y., and Debabov V.G. Manipulating pyruvate to acetyl-CoA conversion in *Escherichia coli* for anaerobic succinate biosynthesis from glucose with the yield close to the stoichiometric maximum. *J. Biotechnol.*, 2015, 214, 33–42. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.09.003
12. Cao Y., Cao Y., and Lin X. Metabolically engineered *Escherichia coli* for biotechnological production of four-carbon 1,4-dicarboxylic acids. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, 38(6), 649–656. doi: 10.1007/s10295-010-0913-4
13. Thakker C., Martínez I., Li W., et al. Metabolic engineering of carbon and redox flow in the production of small organic acids. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2015, 42(3), 403–422. doi: 10.1007/s10295-014-1560-y
14. Sauer U., Eikmanns B.J. The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2005, 29(4), 765–794. doi: 10.1016/j.femsre.2004.11.002
15. Gokarn R.R., Evans J.D., Walker J.R., et al. The physiological effects and metabolic alterations caused by the expression of *Rhizobium etli* pyruvate carboxylase in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, 56(1-2), 188–195. doi: 10.1007/s002530100661
16. Скороходова А.Ю., Стасенко А.А., Гулевич А.Ю., Дебабов В.Г. Эффект активации анаэробных путей на CO₂-зависимую анаэробную утилизацию глюкозы штаммами *Escherichia coli*, дефицитными по основным путям смешанно-кислотного брожения. *Прикл. биохим. микробиол.*, 2018, 54(2), 51–59.
17. Скороходова А.Ю., Гулевич А.Ю., Дебабов В.Г. Влияние вне- и внутриклеточного источников CO₂ на анаэробную утилизацию глюкозы штаммами *Escherichia coli*, дефицитными по независимым от карбоксилирования путям брожения. *Прикл. биохим. микробиол.*, 2017, 53(3), 278–284. doi: 10.7868/S0555109917030151
18. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory. Press., 1989, 1659 p.
19. Каташкина Ж.И., Скороходова А.Ю., Зименков Д.В., и др. Направленное изменение уровня экспрессии генов в бактериальной хромосоме. *Мол. биология*, 2005, 39(5), 823–831.
20. Datsenko K.A., Wanner B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97(12), 6640–6645. doi: 10.1073/pnas.120163297
21. Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Ермишев В.Ю., и др. Новый метод конструирования оперонов с трансляционно-сопряженными генами в бактериальной хромосоме. *Мол. биология*, 2009, 43(3), 547–555.
22. Скороходова А.Ю., Гулевич А.Ю., Моржакова А.А., и др. Анаэробный синтез янтарной кислоты рекомбинантными штаммами *Escherichia coli* с активированным НАД⁺-восстанавливающим пируватдегидрогеназным комплексом. *Прикл. биохим. микробиол.*, 2011, 47(4), 415–423.

23. Bologna F.P., Andreo C.S., and Drincovich M.F. *Escherichia coli* malic enzymes: two isoforms with substantial differences in kinetic properties, metabolic regulation, and structure. *J. Bacteriol.*, 2007, 189(16), 5937–5946. doi: 10.1128/JB.00428-07
24. Kwon Y.D., Kwon O.H., Lee H.S., and Kim P. The effect of NADP-dependent malic enzyme expression and anaerobic C4 metabolism in *Escherichia coli* compared with other anaerobic enzymes. *J. Appl. Microbiol.*, 2007, 103(6), 2340–2345. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03485.x
25. Hoefel T., Faust G., Reinecke L., et al. Comparative reaction engineering studies for succinic acid production from sucrose by metabolically engineered *Escherichia coli* in fed-batch-operated stirred tank bioreactors. *Biotechnol. J.*, 2012, 7(10), 1277–1287. doi: 10.1002/biot.201200046
26. Jantama K., Zhang X., Moore J.C., et al. Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.*, 2008, 101(5), 881–893. doi: 10.1002/bit.22005
27. Zhang X., Wang X., Shanmugam K.T., and Ingram L.O. L-malate production by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, 77(2), 427–434. doi: 10.1128/AEM.01971-10

Inactivation of Malic Enzymes Improves Anaerobic Production of Four-Carbon Dicarboxylic Acids by Recombinant *Escherichia coli* Strains Expressing Pyruvate Carboxylase

A.Yu. SKOROKHODOVA*, A.Yu. GULEVICH, and V.G. DEBABOV

The State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of National Research Center “Kurchatov Institute”, 117545, Moscow, Russia

*e-mail: skorokhodova@genetika.ru**

Received December 4, 2017

Accepted December 12, 2017

Abstract—The genes *maeA* and *maeB* encoding NADH- and NADPH-dependent malic enzymes have been deleted in a recombinant *Escherichia coli* strain with the inactivated mixed-acid fermentation pathways and a modified system of glucose transport and phosphorylation upon the heterologous expression of the pyruvate carboxylase gene. During anaerobic glucose utilization, the parental strain synthesized malic, fumaric, and succinic acids as the main fermentation end products, while pyruvic acid was accumulated as the main by-product resulting from the functioning of the pyruvate–oxaloacetate–malate–pyruvate futile cycle. Upon individual deletions of the *maeA* and *maeB* genes, the mutant strains converted glucose into four-carbon dicarboxylic acids with the increased efficiency still secreting notable amounts of pyruvic acid. The combined inactivation of both malic enzymes in the constructed strain significantly elevated the portion of malic, fumaric, and succinic acids among the fermentation end products with the concomitant decrease in the secretion of pyruvic acid and other by-products due to the abolishment of the action of the futile cycle competing with the target biosynthetic processes.

Key words: *Escherichia coli*, glucose, fermentation, malic enzyme, metabolic engineering, pyruvate carboxylase, fumaric acid, malic acid, succinic acid.

Acknowledgements—The work was financially supported by the Russian Science Foundation (Project 16-14-10389).

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-2-18-25